

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657158

研究課題名(和文) Tbr2に着目した大脳皮質中間増殖細胞の系統進化

研究課題名(英文) Evolution of cortical intermediate progenitors and Tbr2 gene functions

研究代表者

野村 真(NOMURA, TADASHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10323007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：発生期の哺乳類大脳皮質に存在する中間増殖細胞の進化起源を探るため、非哺乳類脳における増殖細胞の特性を解析した。マウス大脳の中間増殖細胞はTbr2を発現し、基底膜側で分裂するbasal progenitors(BPs)として知られている。一方鳥類のBPsは、その形態や遺伝子発現から霊長類のouter Radial Glial Cellsに類似していることがわかった。また鳥類にもTbr2陽性細胞は存在するが、これらは分裂を終えた幼若神経細胞であった。一連の結果から、哺乳類と鳥類は進化の過程で独立にBPsのバリエーションを獲得し、この特性が大きな脳を産み出す一要因となったことが推察された。

研究成果の概要(英文)：To explore the evolutionary origin of mammalian intermediate progenitors, we analyzed progenitor characteristics in non-mammalian pallium. Mammalian intermediate progenitors are Tbr2-positive and undergo mitosis at the basal side of the cortex (basal progenitors: BPs). On the contrary, BPs and Tbr2-positive cells in the developing avian pallium are distinct cell population; the former resemble outer radial glial cells in primates, whereas the latter are post-mitotic neurons. Our results suggest that BPs have independently evolved in mammalian and avian lineages, which provided encephalization in these two amniote groups.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：大脳皮質 中間増殖細胞 Tbr2 outer radial glial 羊膜類 進化

### 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質はヒトを含む哺乳類の高次機能を統合する最上位中枢として機能している。大脳皮質に存在する様々な種類の神経細胞はすべて胎生期の未分化な神経幹・前駆細胞から産生される。神経幹・前駆細胞は分裂期を脳室面で迎えるもの(apical progenitors)と基底膜側で迎えるもの(basal progenitors: BPs)があり、さらにBPsはいくつかのサブタイプに分類される。齧歯類(マウス、ラット)の場合、多くのBPsはT-boxを持つ転写因子Tbr2を発現し、多極性の形態をとり、神経細胞を直接的に産生する中間増殖細胞としての役割を担っている。一方近年、鳥類脳にもBPsやTbr2陽性細胞が存在することが報告されているが、非哺乳類の大脳皮質相同領域におけるこうした細胞の特性は不明であった。予備的知見から、鳥類のTbr2陽性細胞には分裂活性が無いこと、またTbr2のN末端ドメインの構造が種間で異なることを見いだしていた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、哺乳類と鳥類のTbr2陽性細胞の異なる特性と、Tbr2のタンパク質構造の違いとの間に因果関係があるかを分子発生的解析によって明らかにすることを目的とした。この解析を通して、鳥類にTbr2陽性のBPsを人為的に作成することを当初の研究目標として掲げた。

### 3. 研究の方法

マウス(日本SLCより購入)およびニワトリ胚(ヤマギシより購入)の大脳皮質およびその相同領域(外套)の凍結切片を作成し、抗Tbr2抗体を含む様々な抗体を用いて免疫染色を行った。また、マウスTbr2のcDNAを組み込んだ発現ベクター(pCAG-Tbr2)を作製した。ベクター由来のタンパク質の発現は抗Tbr2抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。pCAG-Tbr2およびCdk4/CyclinD1の発現ベクター(ドイツCRTD、Federico Calegari博士より供与)は、電気穿孔法により発生中のニワトリ胚(E4およびE5)の終脳外套に導入した。チミジンアナログであるEdUおよびBrdUは0.1 $\mu$ l(10mM)をガスインジェクター(BEX BJ100)を用いて脳室内に注入した。さらに、発生中のソメワケササクレヤモリ(京都府立医科大学生物学教室にてコロニー維持)、スッポン(大和養殖より購入)、アフリカツメガエル(愛媛大学・村上安則博士より供与)の胚の凍結切片を作製し、各種抗体による免疫染色を行った。当該研究計画は京都府立医科大学遺伝子組換え安全委員会および動物実験倫理委員会の審査をへて承認済みである。

### 4. 研究成果

1) 鳥類Tbr2陽性細胞の特性の解析  
鳥類大脳背側領域におけるTbr2陽性細胞の

特性を詳細に解析するため、その遺伝子発現や発生的起源を解析した。まず増殖活性を再度検討するため、チミジンアナログであるEdUの取り込みや分裂期のマーカーであるリン酸化ヒストンに対する抗体を用いて検討した結果、鳥類のTbr2陽性細胞はこれらの細胞増殖マーカーと全く重ならないことが判明した。さらに免疫化学的手法やGFP発現ベクターによる細胞系譜解析の結果、鳥類Tbr2陽性細胞は外套領域の脳室帯に起源を持つ、分化直後の神経細胞であることが判明した。

#### 2) 哺乳類Tbr2の強制発現による効果

哺乳類と鳥類におけるTbr2陽性細胞の特性の違いがTbr2のタンパク質構造の違いに起因するかを確かめるため、電気穿孔法によって哺乳類のTbr2を発現するベクターを鳥類外套に導入した。その結果、脳室帯に存在する神経幹・前駆細胞のSox2の発現の減少が認められたが、基底膜側での細胞分裂を誘導することはできなかった。従って、哺乳類の中間増殖細胞の特性はTbr2のタンパク質構造とは無関係であることが推測され、当初の仮説は残念ながら棄却された。

#### 3) 鳥類BPsの特性の解析

一方、先行研究により鳥類にも基底膜側で分裂する細胞群が存在することが報告されている。我々の解析からこうした細胞群はTbr2を発現していないことが明らかであり、それではこの鳥類BPsはどのような特性を持っているのかについて、まず免疫組織化学的手法によって検討した。その結果、鳥類BPsは神経幹・前駆細胞マーカーであるSox2やPax6を発現していること、さらに膜以降型GFPによる細胞標識実験により、少なくとも基底膜側に伸張する突起を分裂期でも保持していることが明らかとなった。従って、鳥類BPsは、哺乳類の中でもヒトを含めた霊長類で顕著に数の増大したouter Radial Glial Cells (oRGCs)に非常に類似した特性をもつことが明らかとなった。

#### 4) Cdk4/CyclinD1の強制発現による表現型の解析

以前の研究から、胎生期の哺乳類大脳皮質において細胞周期制御分子であるCdk4とCyclinD1(4D)を共発現させると、Tbr2陽性中間増殖細胞の数が増大することが報告されている。そこで、これらの発現ベクターを作製したドイツ・CRTDのFederico Calegari博士と共同研究を行い、4Dベクターを鳥類脳に強制発現した。その結果、興味深いことにTbr2陽性細胞の数の増大が認められたが、BPsの数に変化はなかった。従って、4Dの強制発現により、哺乳類と鳥類では共通した表現型と種特異的な表現型が得られることが明らかとなった。

#### 5) 羊膜類および非羊膜類におけるBPsの解析

BPsの進化的起源を探るため、爬虫類および両生類の発生期の外套領域における分裂細胞

胞の分布を解析した。その結果、鱗竜類であるヤモリ（マダガスカル産地上製ヤモリ）の脳にはBPsは認められなかったが、主竜類であるカメ（スッポン）の脳には脳室面より実質側で分裂する細胞がごく少数認められた。さらに、両生類であるアフリカツメガエルを解析した結果、基底膜側における分裂細胞を確認することができた。

今回の研究では、当初の仮説である Tbr2 のタンパク質構造と中間増殖細胞との特性との相関を見いだすことはできなかった。しかしながら、鳥類の神経前駆細胞の解析過程において、特に鳥類のBPsが霊長類のoRGCsと似た特性を持つという、神経発生学上大変興味深い観察結果を得ることができた。哺乳類以外でこの細胞群の報告例は未だ無く、我々の比較発生的知見を考えると、進化の過程で鳥類が哺乳類とは全く独自にこうした特性を持つ細胞を進化させたことは驚きに値する。さらに、4Dの強制発現の結果から、細胞周期の変化に感受性の高い細胞群から Tbr2 陽性の細胞が産生される過程は進化的に保存されているが、Tbr2 陽性細胞の増殖活性は種特異的な未知の機構により制御されていることが示唆された。また、脳の実質側で分裂する細胞を作り出す発生機構は様々な動物に潜在的に備わっており、恐らく哺乳類と鳥類はこの機構を改変して中間増殖細胞やoRGsを進化させた可能性が予測された。こうした知見をまとめて現在学術論文の投稿準備に入っている。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計6件)

1. T. Nomura, Y. Murakami, H. Gotoh, K. Ono. Reconstruction of ancestral brains: exploring the evolutionary process of encephalization in amniotes. *Neuroscience Research* (2014) in press. 査読有
2. Y. Wakamatsu, T. Nomura, N. Osumi, K. Suzuki. Comparative gene expression analyses reveal heterochrony for Sox9 in the cranial neural crest during marsupial development. *Evolution & Development* (2014) doi: 10.1111/ede.12083. 査読有
3. K. Ono, A. Clavairoly, T. Nomura, H. Gotoh, A. Uno, O. Armant, H. Takebayashi, Q. Zhang, K. Shimamura, S. Itohara, CM. Parras, K. Ikenaka. Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by Olig2. *Development* (2014) 141. 2075-84. 査読有
4. T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono. Changes in the regulation of cortical neurogenesis contribute to encephalization during amniote brain evolution. *Nature Communications* 4,

2206, doi:10.1038/ncomms3206 (2013). 査読有

5. T. Nomura, M. Kawaguchi, K. Ono, Y. Murakami. Reptiles: A new model for brain evo-devo research. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular Developmental Evolution* 320(2) 57-73 (2013). 査読有
6. 野村真「脳の皺は何故できるのか？—その発生新科学的メカニズム」*Studia Humana et Naturalia* 46, 65-76 (2013). 査読無

〔学会発表〕(計9件)

1. T. Nomura. “Conserved and derived mechanisms of cortical neurogenesis during amniote brain evolution” Neurogenesis2013 2013. 10.16-18. ホテル松島大観荘 シンポジウム Short talk.
2. T. Nomura. “Beef or Chicken? No, I need Gecko!” 3<sup>rd</sup> German-Japan bilateral event on neural stem cells and mammalian neurogenesis. 2013.10.13-15.ラフォーレ蔵王リゾート&スパ セミナー口頭発表
3. 野村真「羊膜類胚操作による大脳皮質進化プロセスの解明」熊本シンポジウム—神経発生を多角的に討論する会 熊本大学医学部 2013.6.25 セミナー講演
4. T. Nomura. “Creation of the mammalian cerebral cortex from ancestor brains” Neuro2013 Symposium. 2013. 6. 20 京都国際会館 シンポジウム講演
5. T. Nomura. “Reptiles: a new model for cortical evo-devo research”. Neuro2013 satellite symposium. Molecular and Cellular Mechanisms of Brain Development and Evolution. 2013. 6.19. 京都府立医科大学図書館ホール シンポジウム講演
6. 野村真「羊膜類胚操作による大脳皮質進化機構の解明」第118回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム・終脳発生研究の進歩 2013. 3.29.サンポートホール高松 シンポジウム講演
7. T. Nomura. “Changes in the regulation of cortical neurogenesis contribute to encephalisation during amniote brain evolution” 東北大学医学部セミナー 2013.3.8. 東北大学医学部創生応用医学研究センター
8. T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono. “Genetic manipulation of reptilian brains: for the study of neocortical evolution” Neuroscience2012. 2012. 9.18-20. 名古屋国際会議場 口頭発表
9. T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono. “Genetic manipulation of Madagascar ground gecko unveils unique characteristics of reptilian cortical neural stem cells” Joint meeting of JSDB & JSCB, 2012. 5.28-30. 神戸国際会議場 口頭発表

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
研究代表者研究内容ホームページ  
<http://tadnom.jimdo.com>  
京都府立医科大学生物学研究室 Facebook  
<https://ja-jp.facebook.com/kpum.biology>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

野村 真 (Nomura Tadashi)  
京都府立医科大学・  
大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10323007

(2)研究分担者 該当無  
( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

後藤 仁志 (Gotoh Hitoshi)  
京都府立医科大学・  
大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20462202